



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 198 59 459 A 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 M 1/42  
C 12 N 13/00  
C 12 N 15/02

21 Aktenzeichen: 198 59 459.3  
22 Anmeldetag: 22. 12. 1998  
43 Offenlegungstag: 29. 6. 2000

DE 198 59 459 A 1

71 Anmelder:  
EVOTEC BioSystems AG, 22525 Hamburg, DE

74 Vertreter:  
v. Bezold & Sozien, 80799 München

72 Erfinder:  
Müller, Torsten, Dr., 12439 Berlin, DE; Schnelle,  
Thomas, Dr., 10243 Berlin, DE; Shirley, Stephen  
Graham, Dr., Brandon, Warks, GB; Fuhr, Günter,  
Prof. Dr., 13187 Berlin, DE; Gradl, Gabriele, Dr.,  
10557 Berlin, DE

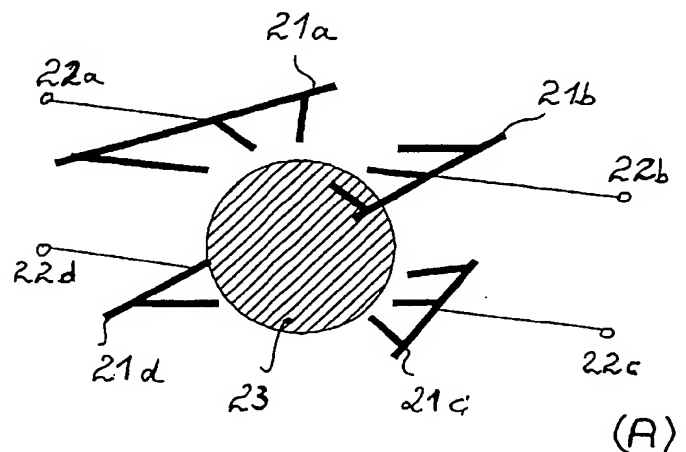
56 Entgegenhaltungen:  
DE 196 53 659 C1  
DE 196 05 830 C1  
DE 195 44 127 C1  
EP 3 24 153 A2  
JP 60-251876 A(Abstract);  
JP 60-251877 A(Abstract);  
JP 61-111680 A(Abstract);  
JP 63-152971 A(Abstract);  
JP 01-285184 A(Abstract);

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Mikrosysteme zur Zellpermeation und Zellfusion

57 Eine Elektroporations- und/oder Fusionsbehandlung mikroskopischer Objekte erfolgt in einem Medium zwischen mindestens zwei Elektroden, wobei die Elektroden miniaturisierte Elektroden in einem Mikrosystem mit einer Kanalstruktur sind, die zum Durchfluß des Mediums mit den Objekten eingerichtet ist.



DE 198 59 459 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Manipulierung und Bearbeitung biologischer Objekte mittels elektrischer Pulse, insbesondere zur Permeation (Poration) und/oder Fusion von Zellen oder von synthetischen, membranumhüllten Gebilden wie Liposomen oder Vesikeln oder zur Permeation von Membran- oder Schichtmaterialien in miniaturisierten Elektrodenstrukturen, und Manipulierungs- oder Bearbeitungsverfahren unter Verwendung einer derartigen Vorrichtung.

Für bestimmte biotechnologische, medizinische oder gentechnische Aufgaben ist die kurzzeitige und reversible Erhöhung der Durchlässigkeit der Umhüllung lebender, in einer Flüssigkeit suspendierter Zellen von Interesse (Übersicht in "Elektromanipulation of Cells", U. Zimmermann, G. A. Neil, CRC, 1996). Neben chemischen, virusbasierten und laserinduzierten Permeationsmethoden hat sich wegen der Einfachheit und Definiertheit der Applikation die Permeation mittels kurzer elektrischer Pulse (Elektroporation oder Elektroporation) entwickelt, wobei gepulste Gleichstromsignale (s. U. Zimmermann et al. in "BBA", Band 641, 1982, S. 160 ff.) oder gehoppte HF-Felder (s. PCT/US88/03457) verwendet werden. Bei den bisher allgemein bekannten, kommerziell verfügbaren Elektroporationsgeräten werden die Elektroporationen und/oder Fusionen in Kammern mit Elektroden durchgeführt, deren Dimensionen wesentlich größer als die Dimensionen der behandelten Objekte sind, wobei die folgenden Nachteile auftreten.

Zellen können bisher nicht in Kulturmedien permeiert werden, da diese eine hohe Leitfähigkeit besitzen und aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit biologischer Zellen das elektrische Feld außerhalb der Zellen verlaufen würde. Außerdem würden die Kulturmedien zu einer hohen thermischen Belastung der zu behandelnden Zellen durch Widerstandsheizungen aufgrund des Stromflusses durch das Kulturmedium führen. Der Anwendungsbereich der herkömmlichen Elektroporationsgeräte ist ferner auf robuste und widerstandsfähige Zellen beschränkt. Außerdem ist eine Optimierung der Fusionsparameter wie z. B. der Feldstärke und der Pulsfrequenz nur eingeschränkt möglich. Dies ergibt sich aus der Größenabhängigkeit des maximal induzierten Transmembranpotentials  $V_M^{\max}$  einer sich in einem externen elektrischen Feld  $E$  befindlichen Zelle (Radius  $R$ ) gemäß  $V_M^{\max} = 1,5 \cdot R \cdot E$  und der praktischen Größenvarianz biologischer Objekte. Dies ist insbesondere dann problematisch, wenn unterschiedliche Zelltypen gleichzeitig permeiert bzw. fusioniert werden sollen oder nur wenige Ausgangszellen zur Verfügung stehen. Schließlich erlauben die herkömmlichen Elektroporationsgeräte keine zuverlässige Einzelzellmanipulation oder -permeation.

Es ist ferner allgemein bekannt, daß sich biologische Objekte auf der Grundlage negativer oder positiver Dielektrophorese mit hochfrequenten elektrischen Feldern manipulieren lassen. Dies wird insbesondere in Mikrosystemen realisiert, wie es beispielsweise von G. Fuhr et al. in "Naturwissenschaften", Band 81, 1994, Seiten 528 ff. beschrieben ist. So zeigen bei einer üblichen Lösungsmittelleitfähigkeit von rund 0,3 S/m biologische Zellen unter der Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder über einen großen Frequenzbereich von rd. 1 MHz bis über 120 MHz negative Dielektrophorese, d. h. die Zellen werden von mit den Hochfrequenzfeldern beaufschlagten Elektroden zu Gebieten niedriger Feldstärke bewegt. In Kulturmedien mit Leitfähigkeiten über 1 S/m zeigen tierische Zellen über alle Frequenzen negative Dielektrophorese.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, eine verbesserte Vorrichtung zur Manipulierung oder Bearbeitung (insbesondere durch Permeation) mikroskopischer Objekte zu schaffen, deren Anwendungsbereich in Bezug auf die Auswahl der Umgebungs- oder Kulturmedien, die Optimierung der Porationsparameter und/oder die Handhabung kleinster Objektmengen (bis hin zu Einzelobjekten) erweitert ist. Die Aufgabe der Erfindung besteht auch darin, ein verbessertes Elektroporationsverfahren unter Verwendung einer derartigen Vorrichtung anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch eine Vorrichtung, ein Elektroporationsgerät bzw. ein Verfahren mit den Merkmalen entsprechend den Patentansprüchen 1, 8, 9 bzw. 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, von den herkömmlichen, makroskopischen Elektroporationsanordnungen zu Mikrosystemen überzugehen, bei denen die Objektbehandlung in Umgebungs- oder Kulturmedien zwischen miniaturisierten Elektroden stattfindet. Gemäß einem ersten wichtigen Aspekt der Erfindung sind die Elektroden in einem Mikrosystem mit einer Kanalstruktur vorgesehen. Im Unterschied zur herkömmlichen Elektroporation in geschlossenen Küvetten ist die Kanalstruktur als Durchflusssystem eingerichtet. Die zu behandelnden Objekte werden somit vom strömenden oder fließenden Medium zu den Elektroden geführt und beim Durchfluß oder während eines zeitlich begrenzten, ortsfesten dielektrophoretischen Positionierens der Objekte in Bezug auf die Elektroden permeiert. Gemäß einem zweiten wichtigen Aspekt der Erfindung werden die Objekte mit einem derart geringen Abstand von den Elektroden permeiert, daß selbst in hochleitfähigen Medien eine Permeation erfolgen kann. Im Mikrosystem sind Elektroden zur Ausübung von Polarisationskräften auf der Grundlage negativer Dielektrophorese und Elektroden zur Elektroporation vorgesehen. Gemäß einem dritten wichtigen Aspekt der Erfindung sind Elektroden vorgesehen, die eine Doppelfunktion erfüllen. Eine erfindungsgemäße Vorrichtung weist z. B. ein Elektrodensystem auf, das simultan zur Halterung der Objekte im Medium oder zur Führung der Objekte in einem strömenden Medium sowie zur Beaufschlagung der Objekte mit elektrischen Feldern zur Realisierung der Elektroporation eingerichtet ist. Im Unterschied zu herkömmlichen Elektroporationsgeräten bilden die Elektroden erfindungsgemäß einen mindestens in zwei zueinander senkrechten Raumrichtungen geschlossenen Käfig, in dem die Objekte manipuliert und der Elektroporation ausgesetzt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Elektrodensystem so eingerichtet, daß die Poration der Objekte entsprechend vorbestimmter Porationsmuster erfolgt. Hierzu besitzen die Elektroden (Pulselektroden) feldformende Einrichtungen wie z. B. Elektrodenspitzen, die entsprechend den gewünschten Porationsmustern angeordnet sind, oder Abschirm- oder Abdeckelemente, die ein Freiliegen der Elektroden in Bezug auf das Medium mit dem oder den Objekten entsprechend dem gewünschten Porationsmuster erlauben.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung wird vorzugsweise als Mikrosystem mit Kanalstrukturen aufgebaut, die in mindestens einem Bereich mit einem erfindungsgemäßen Elektrodensystem ausgestattet sind (Elektroporationsbereich). Vorteilhafterweise werden derartige Elektroporationsbereiche im Mikrosystem mit anderen Bereichen zur Behandlung oder Manipulierung der Objekte z. B. zum Sammeln oder Trennen bestimmter Objekttypen (Manipulationsbereich) kombiniert. Erfindungsgemäße Mikrosysteme werden vorzugsweise als Durchflusssysteme betrieben.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Erfindungsgemäße Vorrichtungen erlauben Objektpermeationen in physiologischen Lösungen. Somit wird die Anwendbarkeit der Elektroporation auf Medien mit hoher Leitfähigkeit (z. B. im Bereich von 0,01 bis 10 S/m) erweitert. Es wird erstmalig eine zuverlässige, berührungsfreie und schonende Permeation einzelner Objekte oder Objektgruppen in freier Lösung ermöglicht. Die Miniaturisierbarkeit des Systems erlaubt eine Erhöhung der Elektrodenhaltbarkeit und eine Verringerung der Elektroporations-Pulsamplituden (bis in den Volt- bis 100 V-Bereich), wobei dennoch die erforderlichen hohen Feldstärken erzielbar sind. Es wird erstmals ermöglicht, die zu behandelnden Objekte simultan an mehreren Stellen entsprechend vorbestimmten definierten Porationsmustern zu behandeln. Es wird eine Kombination der bisher auf makroskopische Anwendungen beschränkten Elektroporationstechnik mit Verfahrensweisen der Mikrosystemtechnik ermöglicht.

Weitere Vorteile bestehen in der erhöhten Effizienz und Ausbeute der Elektroporation, der verminderten Wärmeproduktion durch Minimierung der Elektrodenoberfläche, der Möglichkeit der Permeation unterschiedlich großer Objekte und der zeiteffektiven Permeation von Objekten in Durchflusssystemen bei niedrigen Spannungen.

Die Erfindung ist nicht auf biologische Zellen beschränkt, sondern kann entsprechend mit allen interessierenden synthetischen, membranumhüllten Gebilden wie Liposomen oder Vesikeln oder mit Membran- oder Schichtmaterialien implementiert werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen erläutert. Es zeigen:

**Fig. 1A, 1B** zwei Ausführungsformen von Elektrodensystemen in erfindungsgemäßen Vorrichtungen in schematischer Perspektivansicht,

**Fig. 2A, 2B** zwei weitere Ausführungsformen von Elektrodensystemen in schematischer Perspektivansicht,

**Fig. 3** eine weitere Ausführungsform eines Elektrodensystems mit planaren, strukturierten Elektroden,

**Fig. 4, 5** schematische Darstellungen zur Illustration des Feldlinienverlaufs bei der Elektroporation,

**Fig. 6** eine schematische Perspektivansicht zur Illustration erfindungsgemäßer feldformender Einrichtungen am Elektrodensystem,

**Fig. 7** eine schematische Darstellung eines Mehrkanal-Mikrosystems, das zur erfindungsgemäßen Poration von Objekten unterschiedlicher Größe eingerichtet ist,

**Fig. 8** eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Elektroporators mit Durchflußbetrieb,

**Fig. 9** schematische Darstellungen weiterer Elektrodenformen für dreidimensionale Anordnungen von Elektrodensystemen,

**Fig. 10** schematische Darstellungen zur Illustration der Kombination von Porations- und Manipulierungsbereichen in erfindungsgemäßen Mikrosystemen, und

**Fig. 11** eine weitere Ausführungsform eines Elektrodensystems in schematischer Draufsicht.

Die folgende Erläuterung bezieht sich insbesondere auf die Elektrodengestaltung und -beschaltung in erfindungsgemäßen Vorrichtungen. Einzelheiten der Herstellung von Mikrosystemen mit halbleitertechnologischen Mitteln, der Kombination von Mikrosystemen mit Probenzufuhr- oder Detektionssystemen, der Erzeugung der Hochfrequenzfelder zur Dielektrophorese und der Gestaltung der Permeationspulse werden nicht im einzelnen erläutert, soweit diese an sich aus den herkömmlichen Techniken bekannt sind und in analoger Weise bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung übernommen werden können. Bei den folgenden Darstel-

lungen wird in der Regel ein rundes Objekt gezeigt, das stellvertretend für die obengenannten, zu behandelnden Objekte dargestellt wird. Der Schwerpunkt der folgenden Erläuterung liegt bei der Elektroporation in Durchflusssystemen. Hierbei wird der Elektroporationsbereich der erfindungsgemäßen Vorrichtung von einem Medium (Umhüllungs- oder Kulturmedium) mit den zu behandelnden Objekten durchströmt, wobei miniaturisierte Elektroden Feldbarrieren in Richtungen senkrecht zur Strömungsrichtung (zweidimensionale Feldkäfige) bilden. Die Erfindung ist entsprechend in stationären Systemen insbesondere mit dreidimensionalen Feldkäfigen implementierbar.

Die **Fig. 1A, 1B** zeigen beispielhafte Ausführungsformen von Elektrodensystemen von Durchflußanordnungen erfindungsgemäßer Vorrichtungen. In Mikrosystemen mit Kanalstrukturen (beispielsweise halbleitertechnologisch prozessierte Kanäle in Si-Chips) sind jeweils zwei der zum Elektrodensystem gehörenden vier Elektroden an der oberen bzw. unteren Kanalbegrenzung (Deckel bzw. Boden) angebracht. Die perspektivischen Darstellungen zeigen die Elektroden **11a** und **11b** als obere Elektroden und die Elektroden **11c** und **11d** als untere Elektroden. Die nicht dargestellten Kanalbegrenzungen sind vorzugsweise ebene Halbleiteroberflächen im Chip, auf denen die Elektroden mit geeigneten Depositionsverfahren gebildet sind. Es ist hervorzuheben, daß die Elektroden im wesentlichen schichtförmig auf den Kanalbegrenzungen aufgebracht sind und somit nicht bzw. nur geringfügig in den Kanal hineinragen. Gesonderte seitliche Kanalbegrenzungen zwischen den oberen Elektroden einerseits und den unteren Elektroden andererseits sind aufgrund der Feldkäfigfunktion des Elektrodensystems nicht erforderlich. Das Elektrodensystem ist zur Ausbildung elektrischer Feldbarrieren auf der Grundlage negativer Dielektrophorese zwischen den Objekten **13** und den oberen bzw. unteren Kanalbegrenzungen bzw. den sich seitlich anschließenden Kanalaräumen eingerichtet.

Im Unterschied zu herkömmlichen Elektroporationskammern werden erfindungsgemäß mindestens zwei (vorzugsweise vier oder mehr) Elektroden dreidimensional in einem Kanal angeordnet. Die Objekte **13** (z. B. biologische Zellen) werden durch eine Medienströmung oder eine andere Kraft (Pfeilrichtung in **Fig. 1A**) durch das Elektrodensystem geführt und auf der Grundlage negativer Dielektrophorese von den Elektroden weg in den Zentralbereich des Kanals gedrückt. Zur Erzielung bestimmter Bewegungsabläufe können die Elektroden **11a–11d** bandartig verschieden gestaltet sein, so z. B. kurvenförmig (**Fig. 1A**) oder gerade (**Fig. 1B**).

Das Elektrodenmaterial wird anwendungsabhängig gewählt und besteht vorzugsweise aus Platin, Titan, Tantal oder Legierungen aus diesen. Die Dicke der Elektrodenbänder liegt im  $\mu\text{m}$ -Bereich und ist vorzugsweise  $< 1 \mu\text{m}$ . Charakteristische Kanalquerdimensionen liegen im Bereich von rd.  $1 \mu\text{m}$  bis  $100 \mu\text{m}$ .

Die Elektroden **11a–11d** sind jeweils entsprechend mit elektrischen Steuerleitungen **12a–12d** verbunden. Die Steuerleitungen führen zu einer (nicht dargestellten) Steuereinrichtung, die einen Hochfrequenzgenerator zur Erzeugung der Hochfrequenzfelder für die negative Dielektrophorese und einen Pulsgenerator zur Erzeugung der Permeationspulse enthält. In diesem Fall funktionieren die Elektroden simultan als Hochfrequenz- und Pulselektroden.

Beim erfindungsgemäßen Betrieb werden die zu behandelnden Objekte **13** mit dem Medium durch den Kanal mit dem Elektrodensystem **11a–11d** geführt. Das Elektrodensystem wird simultan mit HF-Spannungen (Bereich z. B. 1 MHz bis über 120 MHz) und Permeationspulsen (Dauer  $\mu\text{s}$ -Bereich, Amplitude bis 100 V) beaufschlagt. Die Objekte werden somit simultan in den Zentralbereich des Ka-

nals gedrückt, wo die Permeationspulse wirken, die zu einer reversiblen Öffnung der Zellmembran führen. Die simultane Nutzung des Elektroden systems für beide Funktionen stellt einen besonderen und bei der früheren Betrachtung herkömmlicher Elektroporationsgeräte und Mikrosysteme nicht erwarteten Vorteil dar.

Die in Kanalströmungsrichtung wirksame Länge der Elektroden 11a-11d kann anwendungsabhängig verschieden ausfallen bzw. dazu eingerichtet sein, daß mehrere Objekte 13 (Fig. 1A) gleichzeitig, aber räumlich getrennt im Elektroden system permeiert werden.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung, nämlich die Bereitstellung vorbestimmter Porationsmuster, wird im folgenden unter Bezug auf die Fig. 2A, 2B erläutert, die zwei Ausführungsformen mit Elektroden systemen zeigen, die mit feldformenden Einrichtungen versehen sind. Die Elektroden systeme bestehen aus den Elektroden 21a-21d mit den entsprechenden elektrischen Steuerleitungen 22a-22d und feldformenden Elektroden elementen 25 und 26. In Fig. 2A ist aus Übersichtlichkeitsgründen wie bei Fig. 1A, 1B nur das Elektroden system und das Objekt 23 ohne die Kanalbegrenzungen und ohne andere Teile des Mikrosystems dargestellt. In Fig. 2B sind lediglich die feldformenden Elemente (oder separaten Elektroden) 25a-25j, 26a-26j, das Objekt 23 und zur Verdeutlichung die Ebenen der oberen bzw. unteren Kanalbegrenzung 27, 28, nicht jedoch ggf. vorhandene, die Elemente in Gruppen verbindende Elektrodenbänder bzw. die elektrischen Steuerleitungen dargestellt.

Die feldformenden Elemente 25, 26 sind Elektrodenstrukturen, die sich band- oder linienförmig auf der jeweiligen Kanalbegrenzungsfläche hin zur Kanalmitte erstrecken. Die Längsdimension hin zur Kanalmitte wird derart gewählt, daß die Enden der feldformenden Elemente nur noch einen Abstand von rd. einem bis einem halben Objektdurchmesser vom Objekt 23 entfernt sind. Die Querdimensionen werden so gewählt, daß sich spitzenförmige Strukturen ergeben, die wesentlich dünner als die charakteristische Objektdimension sind.

Die feldformenden Elemente 25, 26 verursachen eine hohe Feldlinienkonzentration und somit hohe Feldstärken in lokal eng begrenzten Bereichen. Damit ergibt sich auch im Medium eine Feldlinienbündelung und somit ein dielektrischer Durchschlag an bestimmten Orten auf der Oberfläche des Objekts 23. Die örtliche Verteilung der Durchschläge entspricht der Verteilung der feldformenden Elemente und ergibt ein vorbestimmtes Porationsmuster.

Die Fig. 2A zeigt eine Ausführungsform mit vier Elektroden 21a-21d mit einer räumlichen Anordnung analog zu Fig. 1A. Die Fig. 2B hingegen ist eine Multielektrodenanordnung, die als Durchflußsystem oder als stationäres System mit einem geschlossenen Feldkäfig betrieben werden kann. Es ist möglich, daß jedes der feldformenden Elemente 25a-25j, 26a-26j gemäß Fig. 2B eine separate Elektrode mit einer eigenen elektrischen Steuerleitung darstellt. Erfindungsgemäß ist es nicht zwingend erforderlich, daß die Elektroden die genannte Doppelfunktion erfüllen. Sind beispielsweise viele, fein strukturierte feldformende Elemente für die Elektroporation gemäß Fig. 2B vorgesehen, so ist es möglich, daß diese Spitzenelektroden bei Ansteuerung mit einer Hochfrequenz-Spannung keine genügenden Feldkräfte aufbringen, um das zu behandelnde Objekt im interessierenden Bereich zu positionieren oder zu fokussieren. In diesem Fall können gesonderte (nicht dargestellte) Elektroden zur Erzeugung geeigneter Feldbarrieren vorgesehen sein.

Zur Erhöhung der lokalen Feldlinienkonzentration können an den kanalseitigen Enden der feldformenden Elemente zusätzlich (nicht dargestellte) Spitzen- oder Kantenstrukturen vorgesehen sein.

Fig. 3 zeigt eine weitere Ausführungsform mit planaren oder scheibenförmigen Elektroden 31, 32, zwischen denen das Objekt 33 mit einem Durchflußsystem hindurchgeführt wird. Diese Ausführungsform ist somit eine Zweielektrodenanordnung, bei der wieder die Elektroden eine Doppelfunktion in Bezug auf die Dielektrophorese und die Elektroporation erfüllen. Jede der Elektroden 31, 32 besitzt eine innere sternförmige Ausnehmung, so daß das Elektrodenmaterial Spitzen 34 bildet, die analog zu den feldformenden Elementen 25, 26 in den Fig. 2A, 2B Feldlinienkonzentrationen und somit ein bestimmtes Porationsmuster auf dem Objekt 33 ergeben, sobald die Durchschlagsspannung erreicht ist.

Die Fig. 4 und 5 illustrieren die feldformende Wirkung der Elektroden bzw. der feldformenden Elemente bei erfindungsgemäßen Vorrichtungen. Fig. 4a zeigt den Feldlinienverlauf in der Nähe und durch eine biologische Zelle 43 bei niedriger Außenleitfähigkeit, wie er beispielsweise bei herkömmlichen Permeationsanordnungen gegeben ist. Fig. 4b zeigt die Situation bei hoher Außenleitfähigkeit. Die bei niedriger Außenleitfähigkeit auftretende Bündelung der Feldlinien 41 im Bereich 43a, 43b der Oberfläche des Objekts 43 kann bei höher leitender Außenlösung nicht erreicht werden, da die Feldlinien 41 das Objekt 43 vorrangig umfließen und weniger durchsetzen. Wird hingegen gemäß Fig. 5 das Ende der Elektrode bzw. des feldformenden Elements 51 mit möglichst geringer Querdimension (d. h. möglichst spitz, Krümmungsradius  $\ll$  K Objektradius) nahe an die Objektoberfläche (z. B. Oberfläche einer biologischen Zelle) 53 angeordnet, so können auch in hoch leitfähigen Außenlösungen (physiologische Kulturmedien) genügend hohe Feldstärken für die Elektroporation erzielt werden. Der Abstand der Spitze der Elektrode 51 von der Objektoberfläche beträgt vorzugsweise weniger als ein Objektdurchmesser. Die Feldlinien 52 zeigen den Bereich des dielektrischen Durchbruchs durch die Membran oder Oberfläche des Objekts 53.

Eine andere Gestaltung feldformender Elemente ist in Fig. 6 illustriert. Bei diesem Elektroden system sind zwei Elektroden 61, 62 in planarer, flächiger Gestaltung vorgesehen. Die feldformenden Elemente werden durch Isolationschichten 65 auf jeder der Elektroden auf der dem Kanal bzw. den Objekten zugewandten Seiten gebildet. Die Isolationschichten 65 besitzen an vorbestimmten Positionen Ausnehmungen oder Öffnungen 54, an denen die metallische Elektrodenfläche (dunkel dargestellt) mit dem Medium in Berührung kommt. Die Ausnehmungen 64 können in vorbestimmter Weise mit den verschiedensten Öffnungsformen mit eckigen, kurvenförmigen oder langgestreckten Umhüllungen vorgesehen sein. Die Elektroden 61, 62 sind auf Substraten (nicht dargestellt) mit den Methoden der Halbleitertechnologie prozessiert. Als Substratmaterial kommt hier wie bei den anderen Ausführungsformen neben Halbleitermaterial (z. B. Silizium) auch Glas, Kunststoff, Keramik oder dgl. in Frage. Das Bezugszeichen 63 bezeichnet das Objekt, das im Kanal zwischen den Elektroden 61, 62 hindurchgeführt oder hindurchgeströmt wird.

Die Ausnehmungen 64 bewirken analog zur Funktion der feldformenden Elemente in Spitzenform eine Konzentration der Feldlinien, so daß sich eine Permeation des Objekts 63 an bestimmten Stellen ergibt bzw. das vorbestimmte Porationsmuster ergibt.

Ein besonderer Vorteil der Ausführungsform gemäß Fig. 6 besteht darin, daß Belastungen des Elektrodenmaterials durch relativ hohe Pulsspannungen verringert werden. Die Pulsspannungen können hier wie bei den anderen Ausführungsformen im Bereich von 1 V bis zu einigen 100 V liegen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Kombination eines miniaturisierten Elektroporationsystems gemäß einer der oben erläuterten Ausführungsformen mit einem miniaturisierten Objektmanipulator und/oder -detektor, wobei eine Elektroporation der Objekte nur an vorbestimmten Objekten oder entsprechend vorbestimmter Zeitmuster vorgenommen wird. Ein derartiges System kann anwendungsabhängig analog zu den in Fig. 7 gezeigten Grundstrukturen gestaltet sein.

Fig. 7 ist eine schematische Draufsicht auf ein miniaturisiertes Mehrkanalsystem, bei dem zwei Kanäle 71, 72 vorgesehen sind, die von Randlelementen 73a begrenzt und durch Trennelemente 73b (Spacer) getrennt sind. Die Kanäle 71, 72 werden in Pfeilrichtung von einem Medium durchströmt.

Das Mikrosystem umfaßt einen Manipulationsbereich A und einen Elektroporationsbereich B. Im Manipulationsbereich A erfolgt eine Trennung einströmender Objekte und/oder eine Detektion. Beim dargestellten Beispiel ist im Manipulationsbereich A ein Paar von Ablenkelektroden 76 vorgesehen, die sich im Kanal 71 schräg zur Strömungsrichtung erstrecken. Die Ablenkelektroden umfassen eine untere Elektrode am Kanalboden (nicht dargestellt bzw. verdeckt) und eine obere Elektrode an der oberen Kanalbegrenzung. Zwischen den Elektroden kann das Medium frei durchströmen, wobei jedoch bei Beaufschlagung mit einem hochfrequenten Wechselfeld eine elektrische Feldbarriere aufgebaut wird, die sich im Kanal 71 schräg zur Strömungsrichtung erstreckt.

Die dielektrophoretischen Kräfte sind abhängig vom Objektvolumen. Bei biologischen Objekten werden zur Vermeidung von Membranschädigungen Wechselfelder mit Frequenzen oberhalb von 10 MHz verwendet. Beim dargestellten Beispiel erfolgt ein Einstromen eines Zellgemisches bestehend aus großen Zellen 74 und kleinen Zellen 75. Die Spannung zwischen den Ablenkelektroden wird derart gewählt, daß auf die großen Zellen 74 eine genügend große dielektrophoretische Abstoßungskraft wirkt, so daß diese entlang der Erstreckungsrichtung der Ablenkelektroden durch eine Öffnung zwischen den Trennelementen 73b in den zweiten Kanal 72 überführt werden. Die kleinen Zellen 75 hingegen können die Feldbarriere zwischen den Ablenkelektroden 76 passieren und bleiben im ersten Kanal 71.

Stromabwärts in den Kanälen sind Detektoren 78 vorgesehen. Falls an diesen der Vorbetritt von Zellen z. B. elektrisch oder optisch detektiert wird (z. B. durch eine Widerstandsmessung oder mittels Photodioden), so wird unter Berücksichtigung der Strömungsgeschwindigkeit mit einer bestimmten Verzögerungszeit im Elektroporationsbereich B die Elektroporation mit den Elektroden 77, 77a ausgelöst. Die Porationsparameter und die Elektrodengröße ist dabei an die getrennten Zellgrößen angepaßt. Bei den Elektroden 77, 77a handelt es sich vorzugsweise um dreidimensionale Elektrodenanordnungen, wie sie beispielhaft oben erläutert wurde. Die Elektroden sind wiederum am Boden bzw. Deckel des Kanals 71 oder 72 angebracht. Das Auslösen eines Fusions- oder Korrelationspulses kann rechnergestützt oder durch einen detektorgekoppelten Schalter erfolgen.

Nach der Permeation können die permeierten Zellen 79, 80 gegebenenfalls dielektrisch gesammelt und fusioniert werden, wobei wiederum Ablenkelektroden benutzt werden.

Das in Fig. 7 beispielhaft gezeigte System läßt sich anwendungsabhängig beliebig auf mehr Kanäle, komplexere Ablentechniken und Elektroporationen an mehreren Stufen erweitern.

Fig. 8 zeigt ein weiteres Beispiel eines Mikrosystems, das zur mehrstufigen oder kontinuierlichen Permeation ohne zu-

sätzliche Sensoreinrichtungen eingerichtet ist. Beim Mikrosystem gemäß Fig. 8 führt ein Kanal 80 zwischen zwei Begrenzungen 81 eine Strömung eines Mediums mit den Objekten 83. Seitlich an den Kanalbegrenzungen 81 sind Elektroden 82 angebracht, die zur Elektroporation eingerichtet sind. Die Elektroden 82 sind über elektrische Steuerleitungen 85 ansteuerbar, die Schaltelemente 84 zum gezielten Betätigen einzelner Elektroden 82 aufweisen. Die Länge der Einzelelektroden bzw. Elektrodenkombinationen in Kanallängsrichtung, die Strömungsgeschwindigkeit und die gewünschte Porationspulslänge und -wiederholdauer erlauben eine kontinuierliche Permeation der Objekte während des Durchtritts durch den Kanal. Bei Elektroden mit einer Länge von z. B. 1 mm und einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s ist sichergestellt, daß bei einer Pulsperiode von 1 s jede Zelle pro Periode einen Puls erfährt. Der Einsatz einer Vielzahl von Einzelelektroden anstelle einer sich lang erstreckenden, einheitlichen Elektrode besitzt den Vorteil, daß an einer integralen Elektrode Spannungsverluste und Erwärmungen auftreten würden, die die Elektroporation nachteilig beeinflussen könnten.

Fig. 9 zeigt Abwandlungen der Elektrodenanordnung gemäß Fig. 8. Von den dreidimensionalen Elektrodensystemen ist jeweils nur eine Ebene dargestellt. Vorzugsweise wird die zweite Ebene sandwichartig spiegelsymmetrisch über der ersten Ebene angebracht. Die geraden Elektroden 91A parallel zum Kanal besitzen den Vorteil, daß das Feld eine gleichbleibende Feldstärke besitzt. Die Kontakte zu den Subelektroden können über Schaltelemente 91A1 extern gesteuert werden. Alternativ können Kurvenformen 91B (Dreiecksform, Sinusform oder sogenannte "castellated" Form) für bestimmte Zelltypen durch Variation der Feldstärke bevorzugt sein. Segmentierte Einzelelektroden sollten derart dimensioniert sein, daß die Einzelsegmente eine Länge von rd. 100 µm in Kanalrichtung besitzen.

Fig. 10 illustriert die Prinzipien der Kombination von Manipulations- und Elektroporationsbereichen. So können entweder zwei getrennte Strukturen 101A oder eine gemeinsame Struktur 101B benutzt werden. Im Manipulationsbereich ("Sammeln") erfolgt eine Beaufschlagung der Elektroden mit dem Hochfrequenzfeld zur Ausbildung von Feldbarrieren, die die Objekte in den Porationsbereich zusammenführen. Es ist nicht erforderlich, daß das Hochfrequenzfeld für die Dielektrophorese laufend angeschaltet ist. Es ist vielmehr möglich, daß die Dielektrophorese beim Durchtritt eines Objekts aktiviert und dazu zeitlich verzögert (rd. 1 ms) die Elektroporation durchgeführt wird. Die Verzögerung hängt je nach Anwendungsfall von der Strömungsgeschwindigkeit im Kanal ab. Für Puls- bzw. HF-Generatoren für die Elektroporation bzw. die Dielektrophorese ist vorzugsweise eine gemeinsame Massenverbindung vorgesehen.

Eine weitere Abwandlung gegenüber der Anordnung 101B in Fig. 10 ist in Fig. 11 gezeigt. Die Elektrodenstruktur 111 verjüngt sich in Bewegungsrichtung der Teilchen bzw. in Strömungsrichtung im Kanal von einem größeren Abstand der Teilelektroden hin zu einem geringeren Abstand der Teilelektroden. Eine derartige Gestaltung erlaubt es, verschieden große Teilchen an verschiedenen Orten zu behandeln, nämlich das kleinere Teilchen 113A weiterstromabwärts als das größere Teilchen 113B.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Elektroporations- und/oder Fusionsbehandlung mikroskopischer Objekte in einem Medium zwischen mindestens zwei Elektroden, wobei die Elektroden miniaturisierte Elektroden in einem Mikrosystem mit einer Kanalstruktur sind, die zum Durch-

- fluß des Mediums mit den Objekten eingerichtet ist.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der die Elektroden Hochfrequenzelektroden zur Positionierung der Objekte in der Kanalstruktur und Pulselektroden zur Elektroporation und/oder Fusion der Objekte umfassen. 5
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, bei der die Hochfrequenzelektroden und die Pulselektroden durch getrennte Elektrodenelemente oder durch gemeinsame Elektrodenelemente gebildet werden. 10
4. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Pulselektroden feldformende Einrichtungen zur Erzeugung eines Porations- und/oder Fusionsmusters aufweisen.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, bei der die feldformenden Einrichtungen durch Spitzenelektroden oder Abschirmelemente mit geeigneten Durchtrittsöffnungen gebildet werden, wobei die durch die Spitzenelektroden oder die Abschirmelemente gebildeten wirksamen Elektrodenflächen eine Dimension besitzen, die wesentlich kleiner als eine charakteristische Dimension des jeweils zu behandelnden Objekts ist. 15 20
6. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Objekte von den Pulselektroden einen Abstand besitzen, der geringer als eine charakteristische Objektdimension ist. 25
7. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der in der Kanalstruktur in Durchflußrichtung des Mediums eine Vielzahl von Pulselektroden angeordnet sind. 30
8. Elektroporationsgerät, das mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 ausgerüstet ist.
9. Elektrofusionsgerät, das mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 ausgerüstet ist.
10. Gerät gemäß Anspruch 8 oder 9, das als Mikrosystem mit einer Multielektrodenanordnung gestaltet ist. 35
11. Gerät gemäß Anspruch 10, bei dem das Mikrosystem charakteristische Dimensionen der Elektroden im Bereich von 100 µm oder geringer und charakteristische Dimensionen der Elektrodenabstände im Bereich von einigen Durchmessern biologischer Zellen besitzt. 40
12. Verfahren zur Elektroporation und/oder Fusion mikroskopischer Objekte, bei dem die Objekte mit einem Medium durch eine Kanalstruktur eines Mikrosystems an mindestens zwei Elektroden vorbeigeführt werden, die zur Elektroporation und/oder Fusion eingerichtet sind. 45
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, bei dem die Objekte in der Kanalstruktur mit Hochfrequenzelektroden auf der Grundlage negativer Dielektrophorese positioniert oder geführt werden. 50
14. Verfahren gemäß Anspruch 12 oder 13, bei dem vor der Elektroporation bzw. Fusion eine Erfassung von Objekteigenschaften und/oder eine Trennung von Objekten mit verschiedenen Eigenschaften erfolgt. 55

---

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

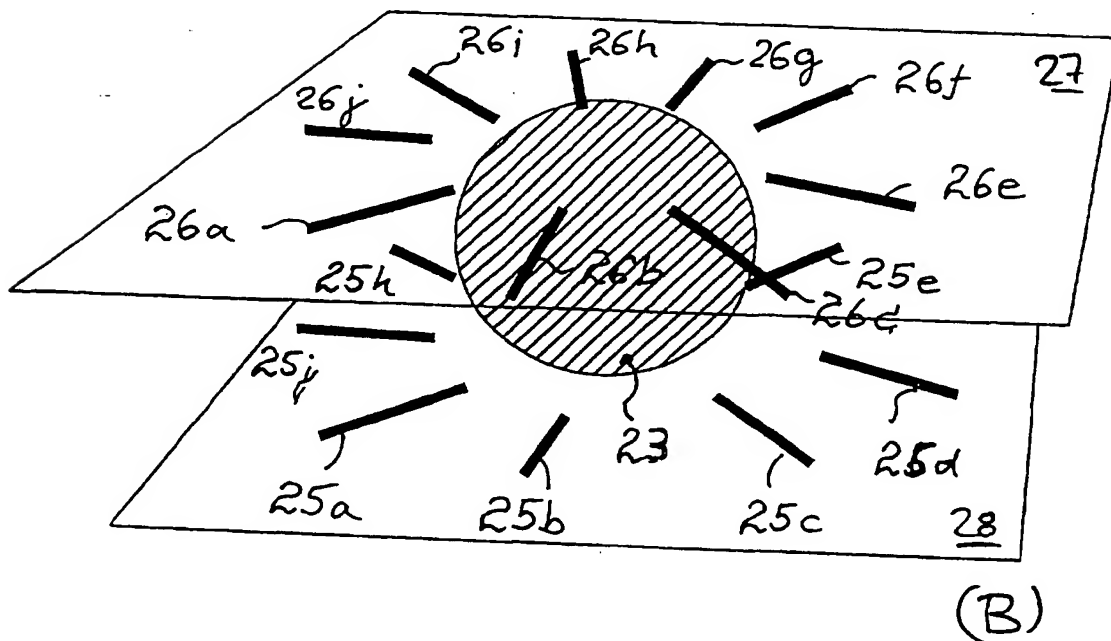
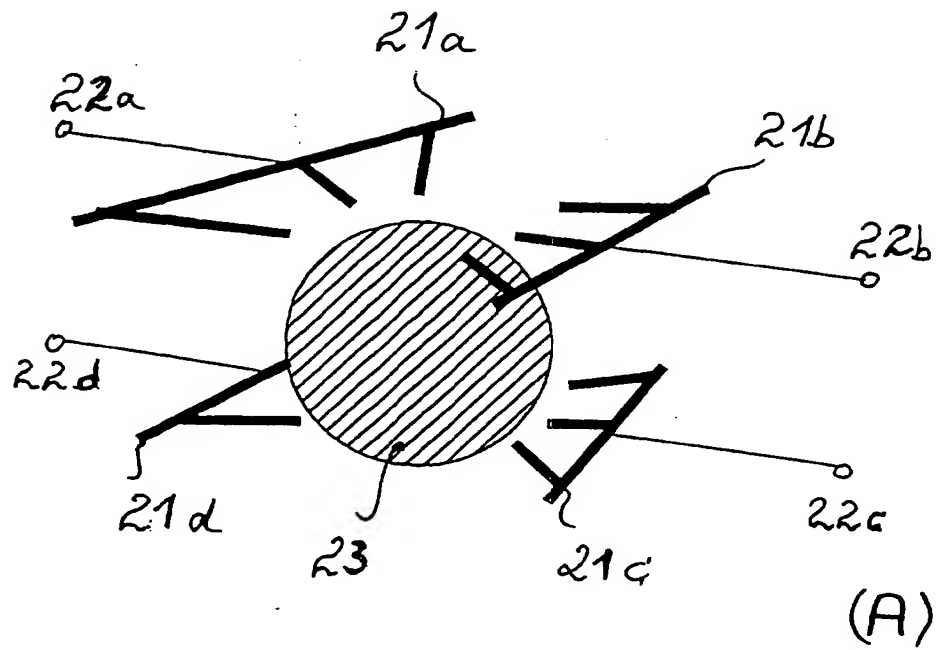


Fig. 2



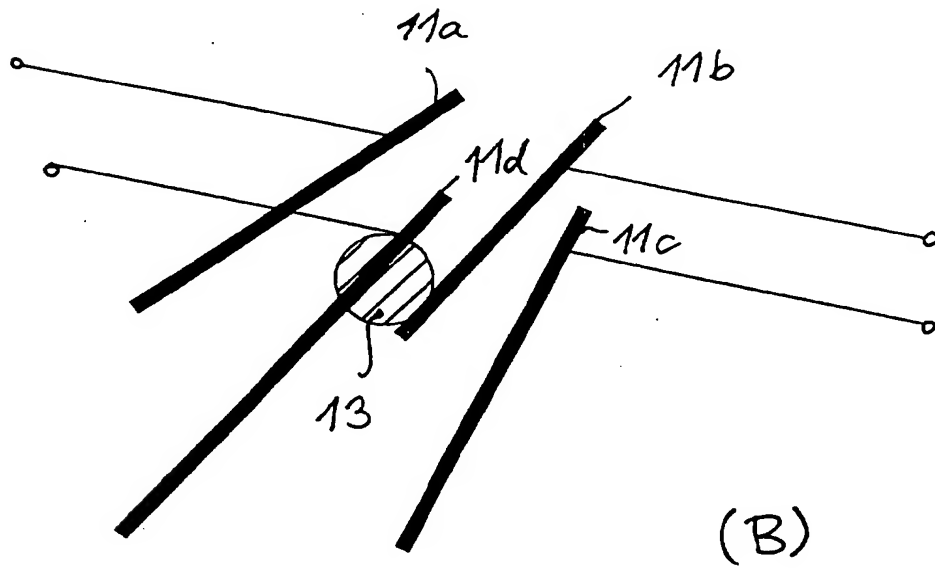
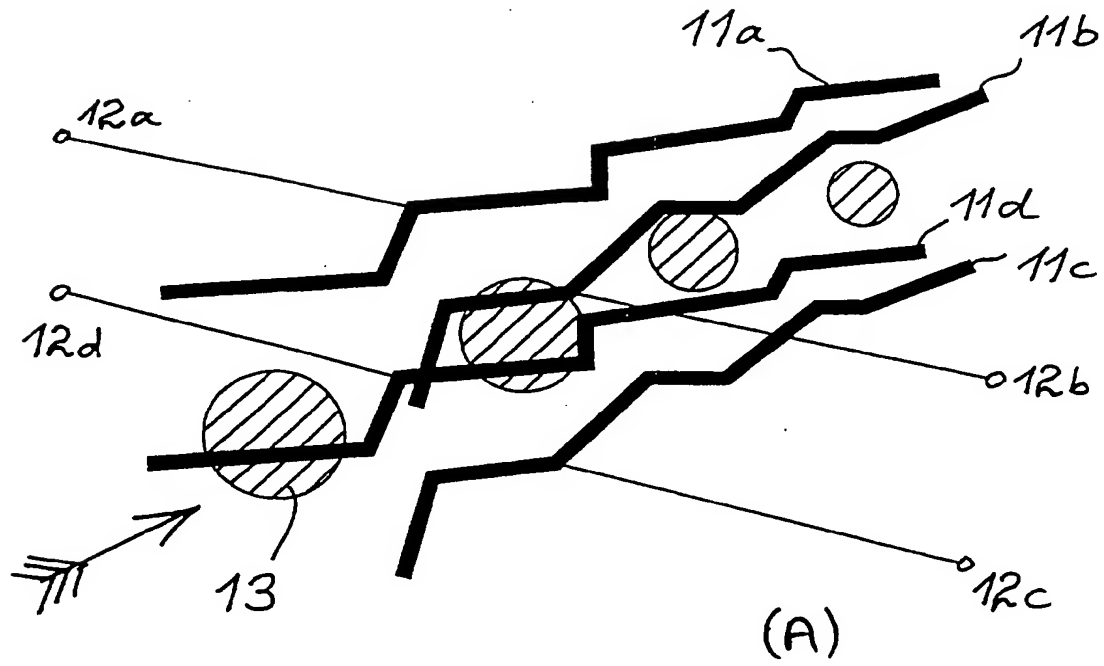


Fig. 1

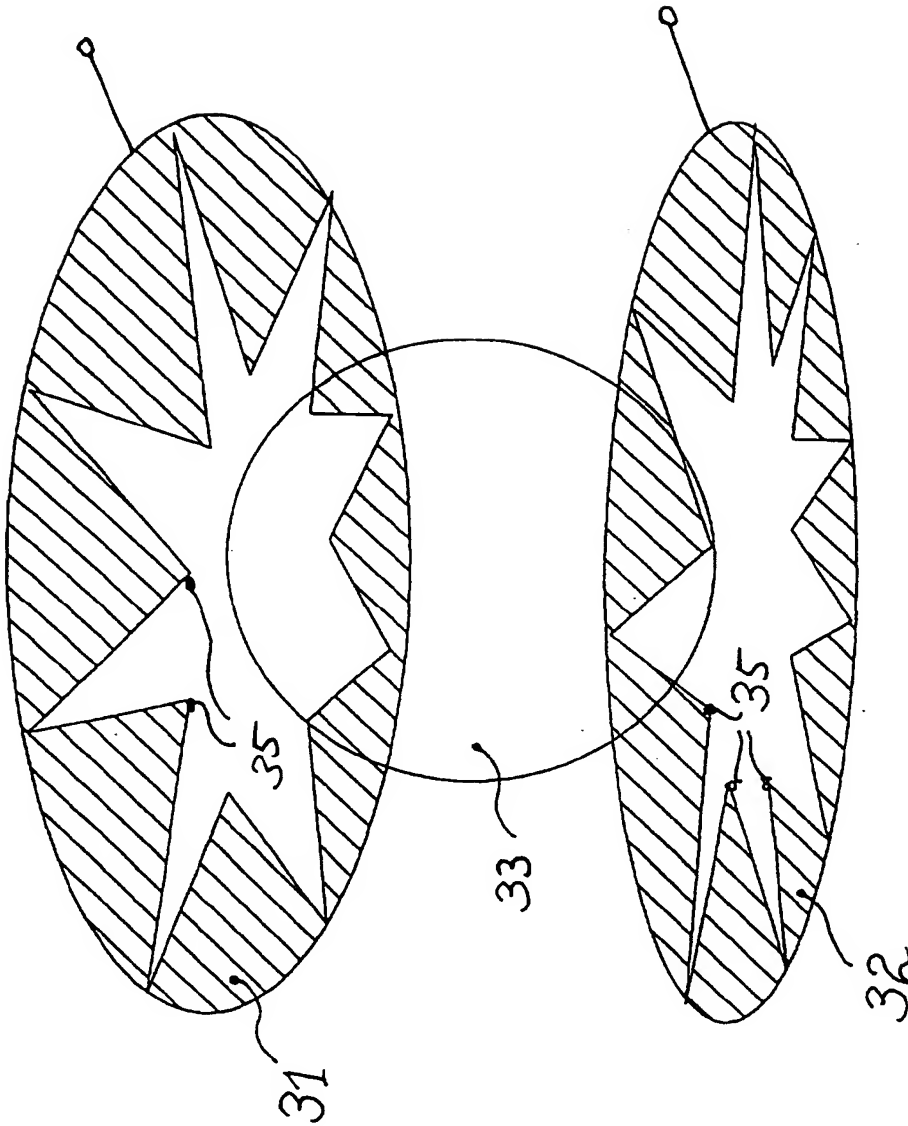


Fig. 3

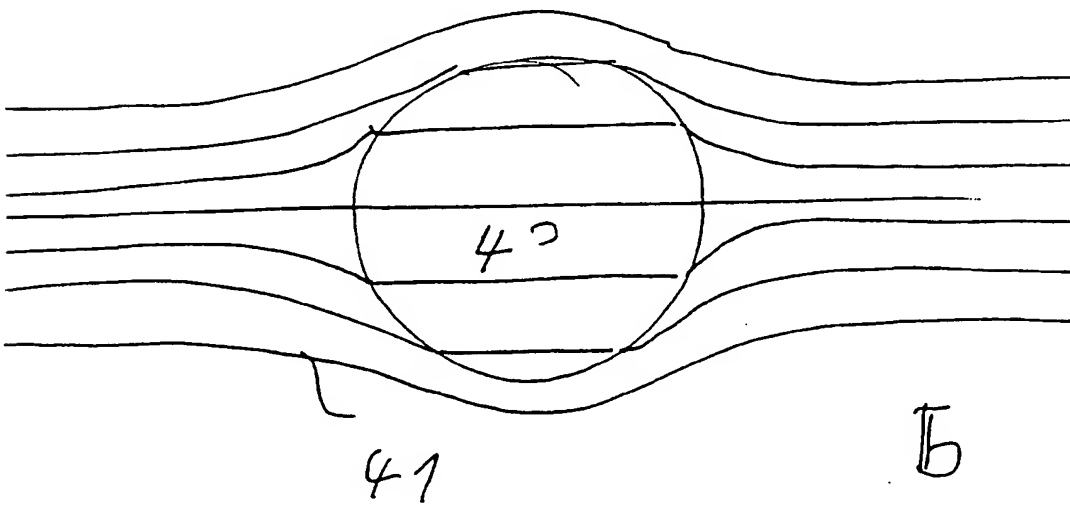
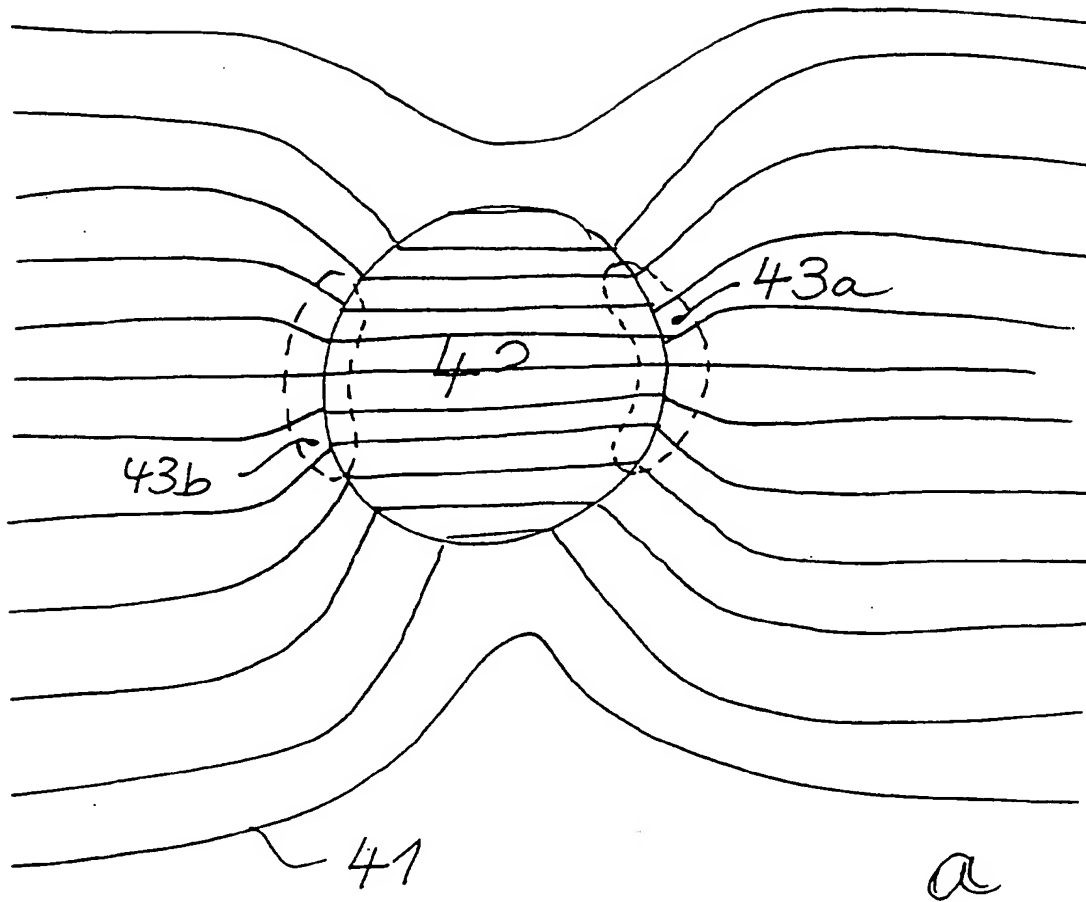


Fig. 4

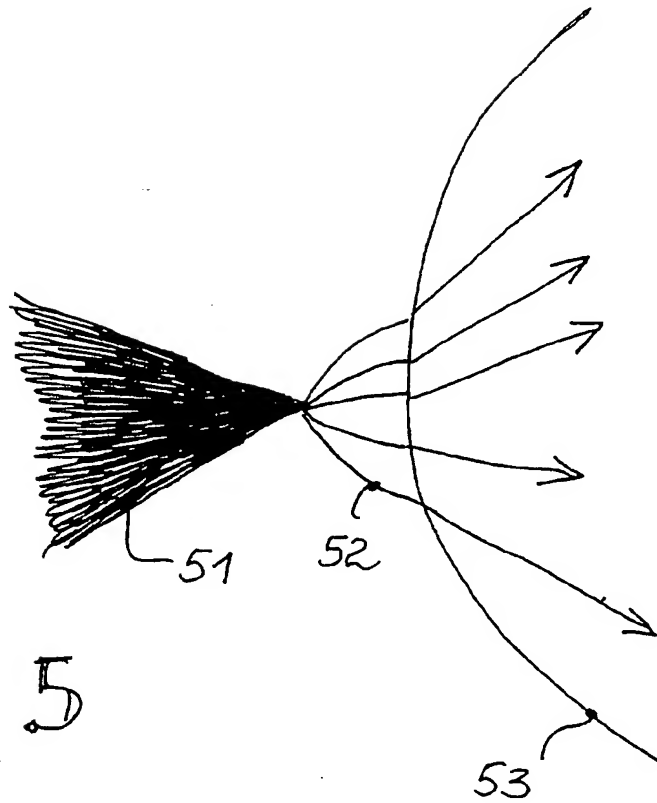


Fig. 5

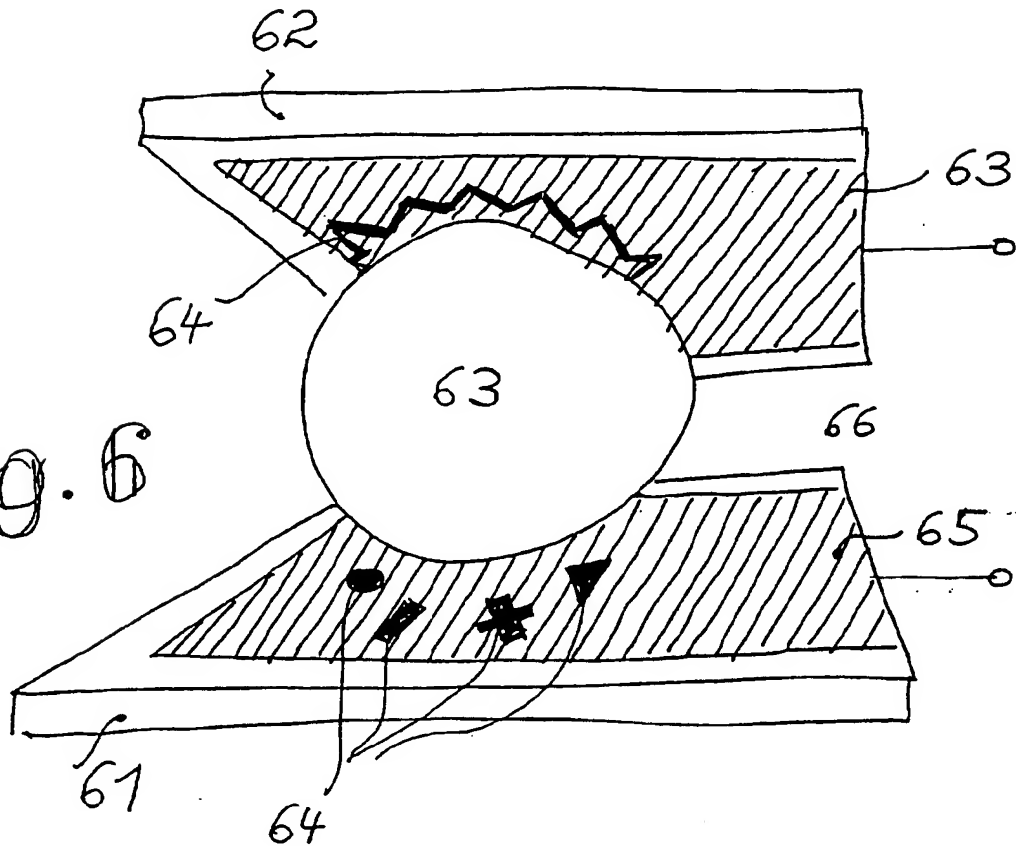
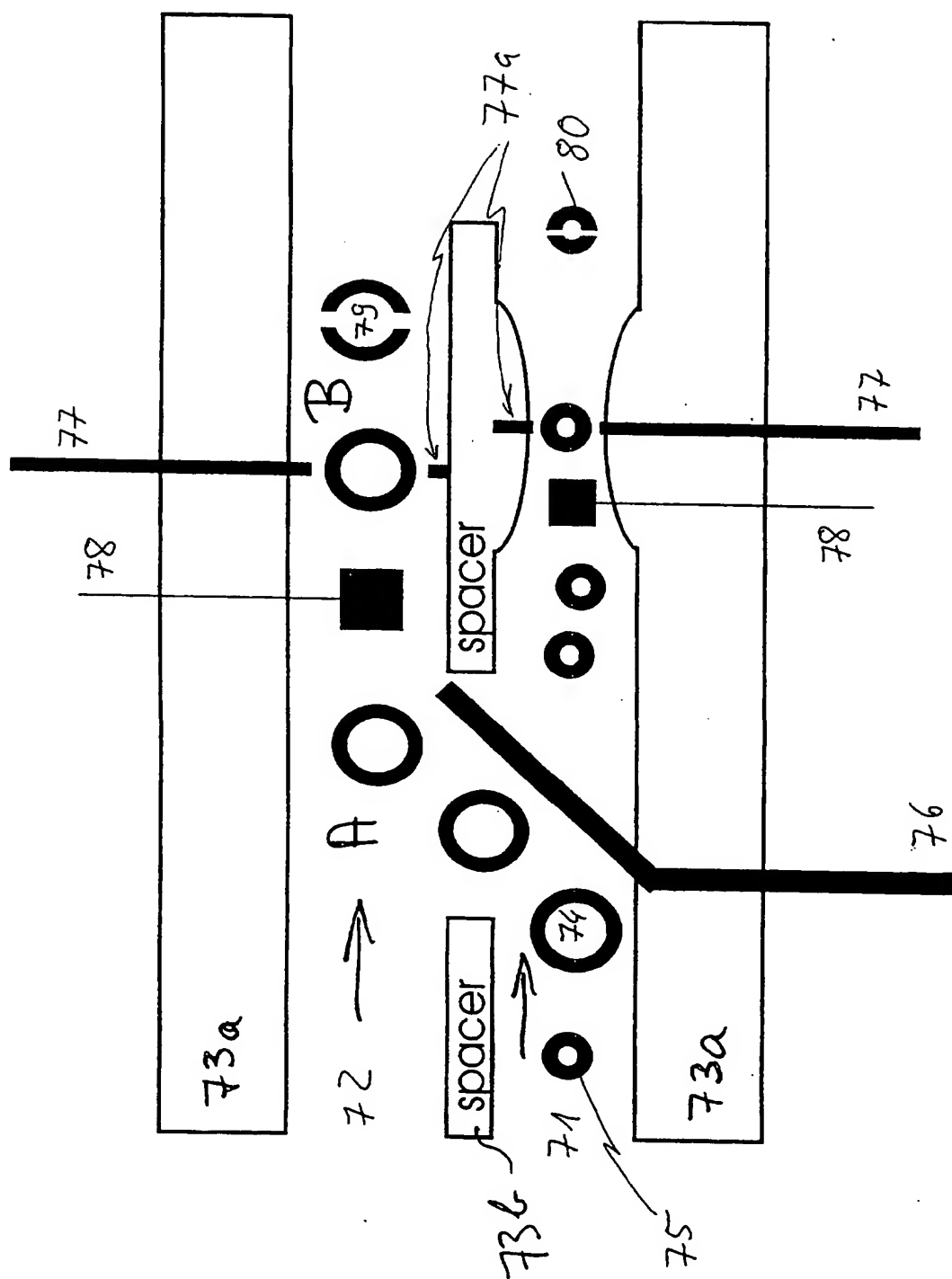


Fig. 6



7. 10

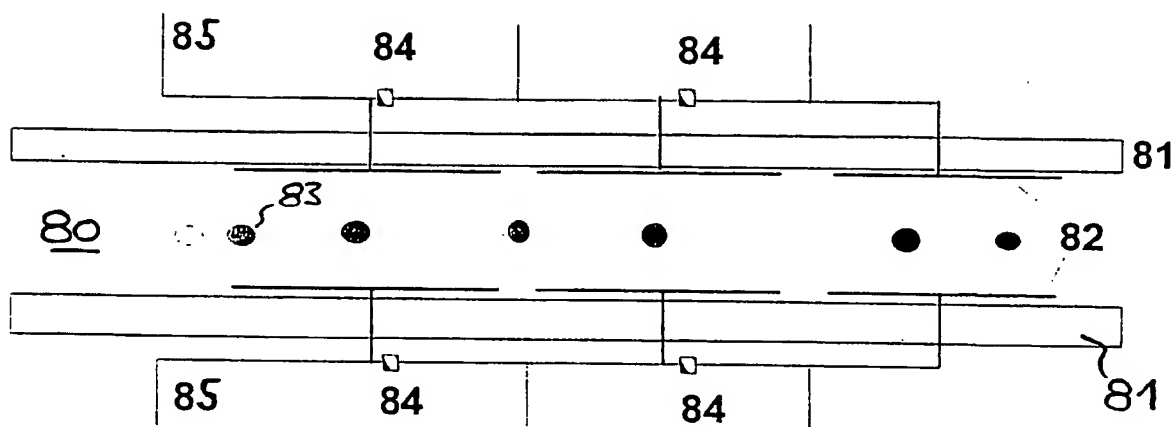


Fig. 8

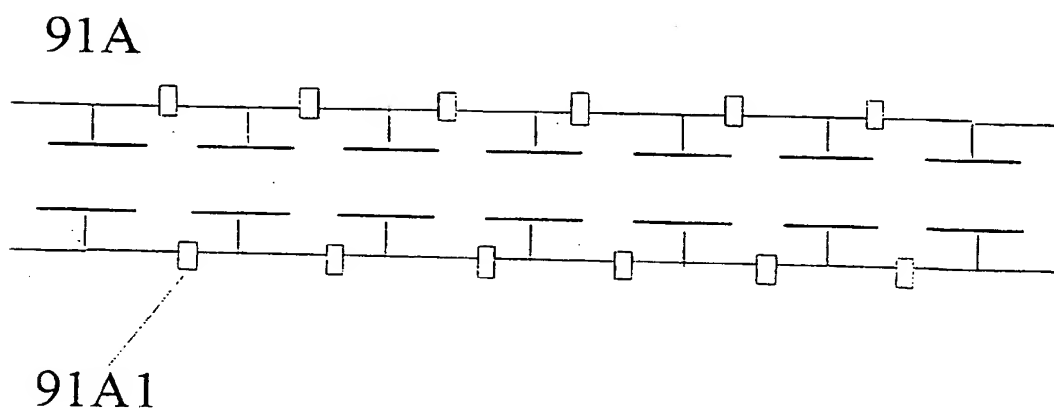
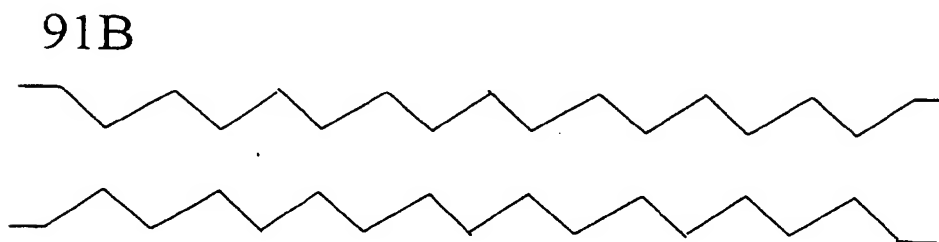
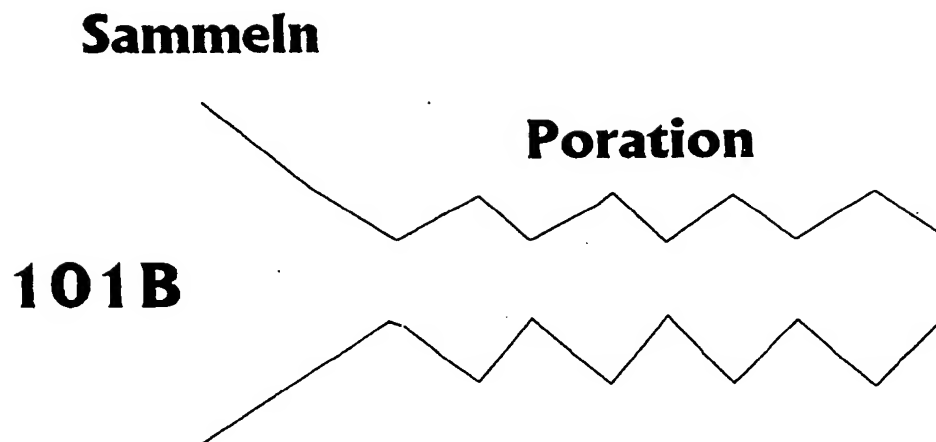
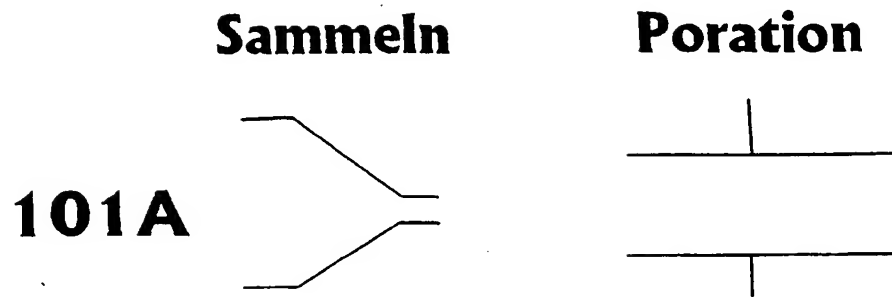


Fig. 9





**Strömungsrichtung --->**

Fig. 10

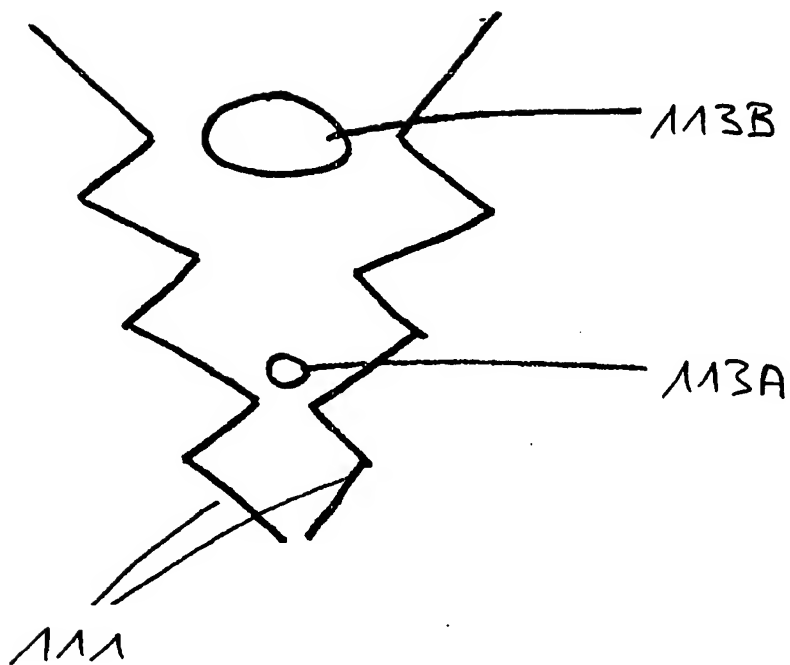


Fig. 11